

Validação e aplicabilidade de um método alternativo para análise da qualidade da água e do dialisato em diálise

Validation and applicability of an alternative method for dialysis water and dialysate quality analysis

Autores

Gabriela Corrêa Carvalho¹ 

Adriana Bugno² 

Adriana Aparecida Buzzo

Almodovar² 

Fernando Pontes de Lima e Silva² 

Terezinha de Jesus Andreoli Pinto¹ 

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Farmácia, São Paulo, SP, Brasil
²Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil

RESUMO

Introdução: Na hemodiálise, os pacientes são expostos a um grande volume de água, o que pode levar a riscos fatais se não cumprir com padrões de qualidade. Este estudo teve como objetivo validar um método alternativo para monitorar a qualidade microbiológica da água tratada e avaliar sua aplicabilidade em análises de diálise e dialisato, para permitir ações corretivas em tempo real. **Métodos:** A validação e aplicabilidade foram analisadas por métodos convencionais e alternativos. Para validação, a endotoxina padrão de *E. coli* foi diluída com água apirogênica em cinco concentrações. Para a análise de aplicabilidade, a água tratada para diálise foi coletada em diferentes pontos do sistema de tratamento (osmose reversa, canalização de drenagem no fundo do tanque de armazenamento, reutilização e circuito) e o dialisato foi coletado em quatro máquinas localizadas em diferentes salas do setor de hemodiálise. **Resultados:** Os resultados da validação obedeceram aos critérios de aceitação da Farmacopeia Brasileira, com exceção das duas últimas concentrações analisadas. Além disso, o critério de robustez realizado sob a Farmacopeia dos EUA estava de acordo com os resultados. **Discussão:** Um fator limitante na análise de aplicabilidade foi a ausência do nível máximo permitido de endotoxina no dialisato pela legislação brasileira. Ao comparar o tempo de análise, o método alternativo consumiu mais tempo que o convencional. Isso sugere que o método alternativo é eficaz no caso de poucas análises, ou seja, análises em tempo real, favorecendo ações corretivas imediatamente. Por outro lado, não suporta a implementação do método alternativo em uma rotina de laboratório devido à alta demanda por análises.

Palavras-chave: Diálise Renal; Qualidade da Água; Estudos de Validação; Endotoxinas; Análise Microbiológica.

ABSTRACT

Introduction: In hemodialysis, patients are exposed to a large volume of water, which may lead to fatal risks if not meeting quality standards. This study aimed to validate an alternative method for monitoring microbiological quality of treated water and assess its applicability in dialysis and dialysate analysis, to allow corrective actions in real-time. **Methods:** Validation and applicability were analyzed by conventional and alternative methods. For validation, *E. coli* standard endotoxin was diluted with apyrogenic water in five concentrations. For the applicability analysis, treated water for dialysis was collected from different points in the treatment system (reverse osmosis, drainage canalization at the storage tank bottom, reuse, and loop), and dialysate was collected from four machines located in different rooms in the hemodialysis sector. **Results:** The validation results were in accordance with the Brazilian Pharmacopoeia acceptance criteria, except for the last two concentrations analyzed. In addition, the ruggedness criterion performed under the US Pharmacopoeia was in agreement with the results. **Discussion:** A limiting factor in the applicability analysis was the absence of the endotoxin maximum permitted level in dialysate by the Brazilian legislation. When comparing the analysis time, the alternative method was more time-consuming than the conventional one. This suggests that the alternative method is effective in the case of few analyses, that is, real-time analyses, favoring corrective actions promptly. On the other hand, it does not support the implementation of the alternative method in a laboratory routine due to the high demand for analyses.

Keywords: Renal Dialysis; Water Quality; Validation Studies; Endotoxins; Microbiological Analysis.

Data de submissão: 16/10/2019.

Data de aprovação: 11/12/2019.

Correspondência para:

Gabriela Corrêa Carvalho

E-mail: gabrielacarvalho57@yahoo.com

DOI: <https://doi.org/2175-8239-JBN-2019-0203>



INTRODUÇÃO

Atualmente, pacientes com doença renal crônica podem ser submetidos a terapia renal substitutiva, tendo como opções diálise peritoneal, hemodiálise ou transplante renal, dependendo do estágio e evolução da doença.^{1,2}

A hemodiálise é um procedimento amplamente utilizado e, durante o tratamento, os pacientes são expostos a um grande volume de água. Se a água utilizada não atender aos padrões de qualidade exigidos pelos órgãos de supervisão, ela pode representar um risco para os pacientes e levar à morte.^{3,4}

Contaminantes químicos e microbianos podem ser prejudiciais aos pacientes em tratamento hemodialítico.⁵ Alumínio, cloramina, fluoreto, cobre e zinco podem ser apontados como contaminantes químicos, enquanto os microrganismos mais comuns encontrados como contaminantes no sistema de água são *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Serratia*, todas as bactérias Gram-negativas e *Mycobacterium*.^{1,6}

Entre os componentes derivados das membranas bacterianas Gram-negativas, destacam-se as endotoxinas, que fazem parte do complexo lipopolissacarídeo. O complexo lipopolissacarídeo possui uma porção lipídica (lipídio A), que confere toxicidade durante a lise, a morte e a multiplicação das bactérias.^{7,8}

As endotoxinas presentes no dialisato não podem ser retidas por uma membrana dialítica danificada, atingindo a corrente sanguínea do paciente e resultando em uma reação pirogênica pela estimulação de citocinas liberadas pelos macrófagos.^{9,10}

Nos Estados Unidos da América, houve seis surtos de contaminação por endotoxinas entre 1973 e 1987, afetando 177 pacientes, mas nenhuma morte foi registrada.⁹ Em um estudo realizado em 30 centros de diálise na Alemanha, observou-se que 12,2% das amostras de água e 27,5% das amostras de dialisato apresentaram concentração de endotoxina superior a 5 EU/mL.¹¹

No Brasil, um estudo analisando a água da diálise na cidade de São Luis/MA, constatou que 100% e 33,33% das amostras apresentaram endotoxinas no pré e pós-tratamento, respectivamente.¹²

Tais incidentes indicam que as unidades de hemodiálise, além de garantir água de qualidade, também devem ter um protocolo bem estabelecido

de desinfecção, uma vez que o concentrado de bicarbonato, um componente da solução de diálise, é suscetível à contaminação bacteriana e elevação dos níveis de endotoxinas.¹

A glicose pode estar presente na solução de diálise para controlar os níveis glicêmicos e otimizar o tratamento do diabetes, mas, como o bicarbonato, é uma fonte de carbono e sua presença pode aumentar não apenas a contaminação bacteriana, mas também a concentração de endotoxinas.^{13,8}

A escolha de métodos analíticos sensíveis e específicos para a análise da água é essencial para obter água de qualidade e garantir a segurança do paciente.¹⁴ Desde 1980, a Farmacopeia dos Estados Unidos descreve o Teste de Lisado de Amebócito *Limulus* (LAL) como um método para analisar endotoxinas em produtos farmacêuticos, substituindo amplamente o uso do teste de pirogênio em coelhos. Embora com abrangência, conceitos e escopos distintos, o ensaio de endotoxina bacteriana substitui e supera as vantagens, na maioria das situações, do teste de pirogênio *in vivo*.⁷

A Farmacopeia Brasileira recomenda dois tipos de testes de determinação de endotoxinas: o teste semi-quantitativo de coagulação em gel e o teste fotométrico quantitativo, que é dividido em turbidimétrico ou cromogênico.¹⁵

Um estudo realizado por Lemgruber et al.¹⁶ determinou que o erro inerente à pipetagem interfere nos resultados do método cromogênico, o que poderia comprometer a confiabilidade. A variabilidade da técnica do analista também é um fator que pode interferir nos testes de LAL.¹⁷

Na tentativa de contornar as diferentes limitações metodológicas, métodos alternativos foram desenvolvidos para proporcionar um nível mais alto de qualidade dos resultados, maior sensibilidade e agilidade, permitindo que ações corretivas sejam tomadas mais precocemente.¹⁵

O método alternativo deve ter atributos como menor tempo de execução, resultados mais rápidos, automação, fácil execução, miniaturização, baixo custo e estar de acordo com os parâmetros analíticos.¹⁸ Nesse contexto, é possível chamar a atenção para o Sistema de Teste Portátil (PTS®), que adota um espectrofotômetro portátil desenvolvido para simplificar a manipulação de amostras e a preparação padrão para cada teste, seja para construção de curvas padrão ou para o teste de

amostras. Quantidades precisas de reagente LAL, endotoxina e substratos cromogênicos são fixadas em um cartucho totalmente livre de pirogênio, eliminando a variabilidade da técnica. Por ser um sistema miniaturizado, pode ser transportado para o ponto de amostragem, fornecendo resultados precisos em tempo real.¹⁷

No entanto, a implementação de métodos alternativos deve ser precedida por uma cuidadosa validação.¹⁵ A palavra validar traduz o ato de documentar que um determinado procedimento seja eficaz e apropriado ao seu objetivo.¹⁹ Para que a validação seja considerada satisfatória, algumas etapas devem ser executadas com maestria, com foco na qualificação do projeto, instalação, operação e desempenho.⁷

No escopo do presente trabalho, características intrínsecas do equipamento e atribuições de seu fabricante levaram à qualificação do desempenho.

A qualificação de desempenho engloba evidências de que o método alternativo seja adequado para uso rotineiro, em conformidade com os critérios de validação, que são regulados por farmacopeias e organizações internacionalmente conhecidas como a *Parenteral Drug Association* (PDA)⁷. As recomendações dos critérios de validação a serem analisados dependem do tipo de análise: qualitativa, quantitativa ou identificação.¹⁵

Se for comprovado que o método alternativo é equivalente, superior ou não inferior ao padrão convencional usado, sua substituição pode ser aceita e estimulada por agências reguladoras de alguns lugares como Austrália, Europa, Japão e Estados Unidos.¹⁹

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi validar o PTS® e avaliar sua aplicabilidade no monitoramento da água tratada para diálise e dialisato por um mês em uma unidade de diálise.

MATERIAL E MÉTODO

VALIDAÇÃO

Para validar o PTS®, a endotoxina padrão de controle (EPC) de *Escherichia coli* foi diluída em água com reagente LAL em cinco concentrações (0,0625, 0,125, 0,25, 0,5 e 1,0 EU/mL), que foram analisadas pelos métodos convencional e alternativo. Para a preparação das diluições de EPC, o frasco foi agitado vigorosamente antes do uso por pelo menos 3 minutos e, em seguida, as diluições em série foram realizadas, agitadas por pelo menos 30 segundos após cada diluição.¹⁵

Além disso, a EPC foi preparada na concentração de 2 λ para o controle positivo do produto (CPP) e o controle positivo da água reagente LAL (PWC).¹⁵

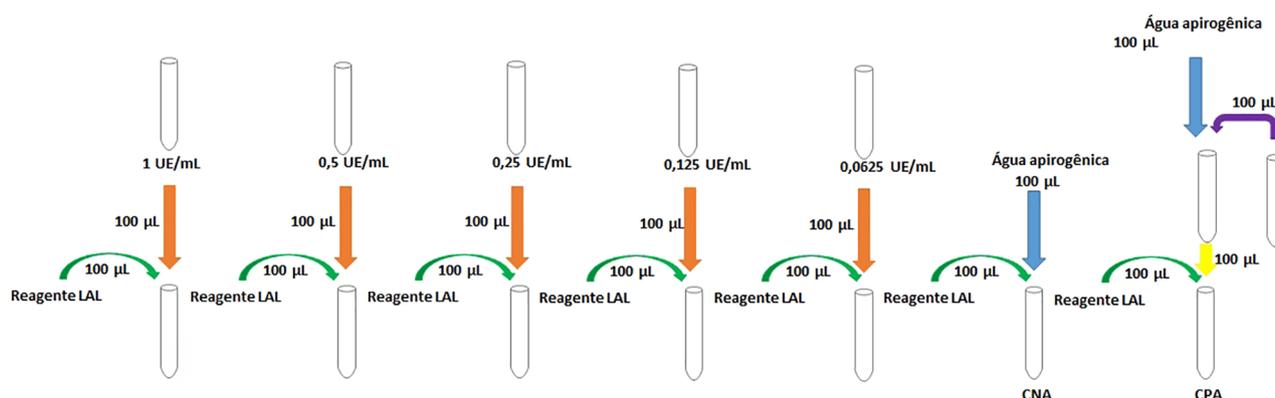
METODOLOGIA CONVENCIONAL

A metodologia convencional foi o método de coagulação em gel. Primeiramente, foi realizada a preparação do reagente LAL, o conteúdo do frasco foi reconstituído com água reagente LAL, de acordo com as instruções do fabricante, e armazenado em um freezer até o uso.

Um volume de 100 μL de reagente LAL foi colocado em sete tubos de ensaio apirogênicos; em cinco deles, foram adicionados 100 μL de cada diluição da amostra, em um tubo foram adicionados 100 μL de água reagente LAL para fazer o controle negativo da água do reagente LAL (NWC) e, em um sétimo tubo, foi realizada a PWC, onde 100 μL foram adicionados a uma solução formada por 100 μL de água reagente LAL mais 100 μL de EPC na concentração de 2λ (Figura 1).¹⁵

Os tubos foram então incubados em banho-maria por 1 hora a 37 ± 1 ° C, livres de vibrações. Após esse período, os tubos foram lidos e a reação

Figura 1. Representação esquemática do teste de coagulação em gel.



foi considerada positiva quando um gel firme permanecesse intacto quando o tubo era invertido (180°). A reação foi considerada negativa quando não houve formação de gel ou o coágulo não manteve sua integridade quando o tubo foi invertido.¹⁵

MÉTODO ALTERNATIVO

O método alternativo foi o sistema Endosafe PTS®, com o cartucho considerado mais adequado, devido ao limite de endotoxinas permitido pela legislação para amostras de água para diálise com sensibilidade de 0,05 a 5 EU/mL.

Após a inserção do cartucho no aparelho, um volume de 25 µL de cada diluição foi pipetado e transferido para cada um dos quatro reservatórios. Cada reservatório tem um canal; em dois deles a amostra reage com o reagente LAL e um substrato cromogênico (ambos presentes no cartucho) e nos outros dois, foi realizada PPC, pois além do reagente LAL, ele contém 0,69 EU/mL de endotoxina. A densidade óptica do canal é analisada com base na curva padrão arquivada internamente.¹⁷ As análises foram realizadas por dois analistas diferentes, que analisaram os dados em triplicata (três cartuchos por diluição), totalizando seis repetições.

Os resultados foram analisados de acordo com os critérios de aceitação descritos na Tabela 1.

APLICABILIDADE DE MÉTODO ALTERNATIVO

Amostras de água tratada de diálise e dialisato foram analisados quanto à presença de endotoxina bacteriana. A água foi coletada de quatro pontos diferentes no sistema: osmose reversa, canalização de drenagem no fundo do tanque de armazenamento, reutilização e circuito. O dialisato foi coletado em quatro máquinas de diálise em funcionamento, localizadas em diferentes salas do setor de hemodiálise (Figura 2).

Para monitorar esta unidade por um mês, foram realizadas quatro coletas consecutivas, sendo a primeira na semana anterior à desinfecção química do sistema de água com ácido peracético a 0,2%, realizada mensalmente.

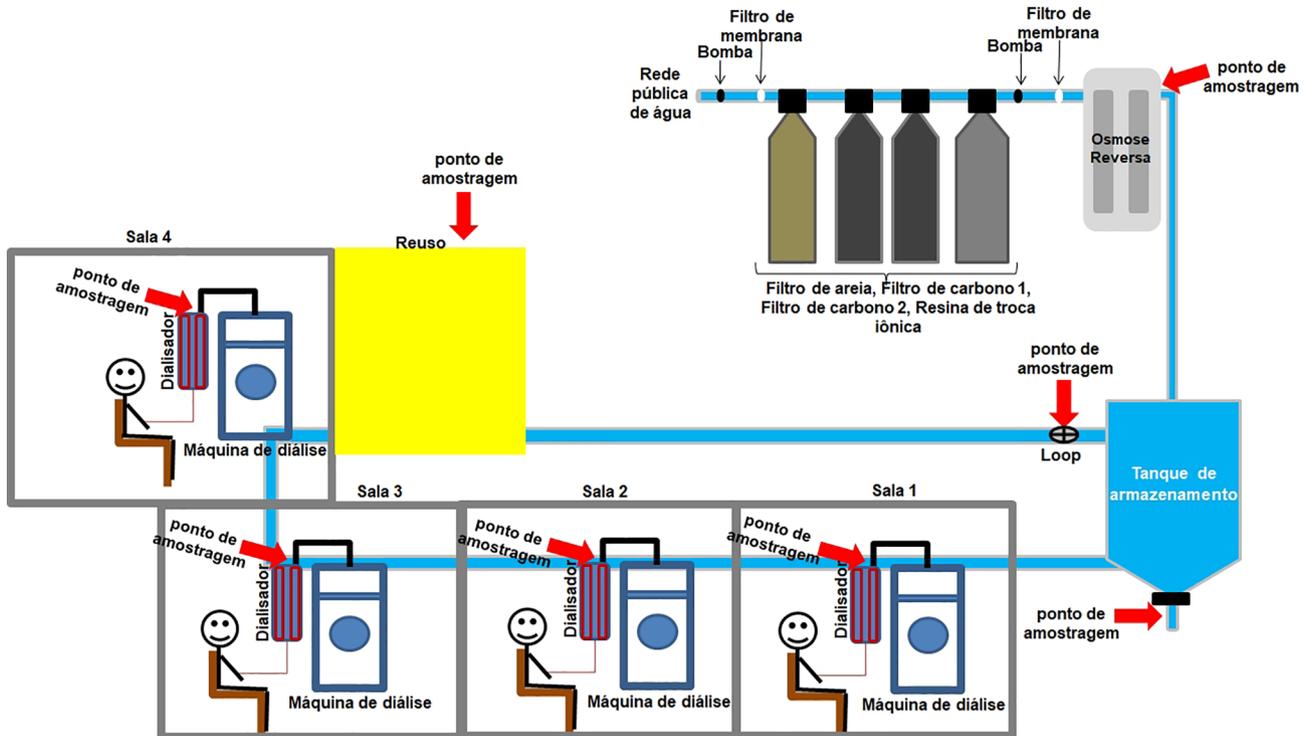
Um volume de 100 µL de reagente LAL foi adicionado aos tubos de teste pirogênicos e um volume de 100 µL de cada amostra (osmose reversa, canalização de drenagem no fundo do tanque de armazenamento, reutilização e circuito) diluído 1: 2 com água reagente LAL foi adicionado, de acordo com o cálculo da diluição máxima válida (DMV),

TABELA 1. DESCRIÇÃO DOS PARÂMETROS, FORMULÁRIOS DE ANÁLISE E CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PARA VALIDAÇÃO DE MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS E BIOLÓGICOS ALTERNATIVOS.

Parâmetros	Formulários de Análise	Critérios de Aceitação
Exatidão	Determinação da porcentagem de recuperação.	A recuperação do método alternativo deve ser de 100 ± 30% maior que o convencional.
Precisão	Determinação do coeficiente de variação.	O coeficiente de variação deve ser menor que 30%.
Especificidade	Interpretação dos resultados	O método deve ser capaz de apresentar resultados positivos para os diferentes microrganismo presentes na amostra.
Limite da detecção	Intepretação dos resultados, seguida pelo teste do qui-quadrado.	Pelo menos 50% dos resultados positivos no método convencional devem ser positivos no método alternativo.
Limite da quantificação	Interpretação dos resultados.	O método alternativo deve ser capaz de determinar a mais baixa carga microbiana com precisão e exatidão.
Linearidade	Cálculo do coeficiente de correlação (R ²) pela análise de dados por regressão linear.	O método alternativo não deve ter um R ² menor do que 0,95.
Intervalo operacional	Interpretação dos resultados.	Determinado com base em estudos de precisão, exatidão e linearidade.
Robustez	Comparação entre replicatas do mesmo analista e entre diferentes analistas.	O método alternativo deverá prover resultados reproduzíveis mesmo com alterações em condições tais como diferentes analistas e diferentes períodos.

Fonte: Adaptado da farmacopeia brasileira e da farmacopeia americana.^{15, 20}

Figura 2. Representação esquemática da água tratada para diálise e amostragem de dialisato.



porque a sensibilidade relatada do reagente LAL usado foi de 0,125 EU/mL e o limite de endotoxina permitido para a água tratada para diálise é de 0,25 EU/mL.²¹

$$DMV = \frac{\text{limite de endotoxina}}{\lambda}$$

Onde λ é a sensibilidade do reagente LAL expressa no rótulo do frasco.¹⁵

As amostras de dialisato foram diluídas nessa mesma concentração. As análises foram realizadas em triplicata (três cartuchos por amostra). NWC e PWC também foram realizados como descrito anteriormente. Além disso, foi realizado o CPP, onde foram adicionados 100 μ L de uma solução feita por 100 μ L da amostra mais 100 μ L de EPC na concentração de 2λ em tubos contendo 100 μ L de reagente LAL.

Os tubos foram então incubados em banho-maria a 37 ± 1 °C por 1 hora, evitando-se vibrações. Após esse período, a leitura foi realizada. As amostras que apresentaram resultados positivos para 0,25 EU/mL foram submetidas a análises adicionais para verificar se os níveis de endotoxina estavam na faixa de 0,25-0,35 EU/mL ou superior a 0,5 EU/mL. Paralelamente, foram pipetadas 25 μ L de cada amostra (não diluída) dos quatro reservatórios em cada um dos cartuchos PTS® (triplicado) para realizar uma comparação com o método convencional.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software Minitab® 17 foi usado para análise estatística.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

VALIDAÇÃO

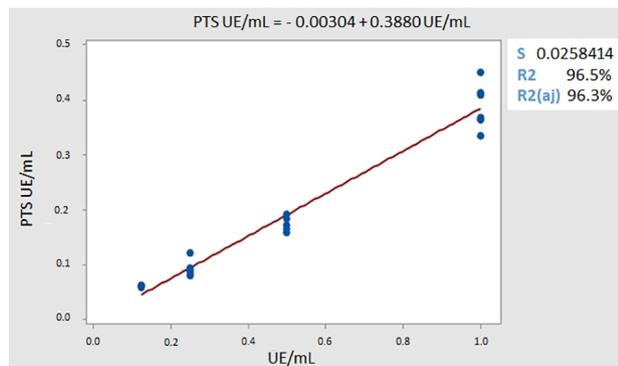
Uma limitação observada durante a análise foi que as réplicas da última concentração, 0,0625 EU/mL, não foram detectadas em nenhuma das réplicas porque o equipamento indicava que estava abaixo do limite de detecção; portanto, não foi utilizado na análise estatística.

LINEARIDADE

A análise de regressão linear (Figura 3) mostrou uma boa correlação entre as duas variáveis, uma vez que o R^2 foi superior a 0,95, sugerindo que os resultados têm linearidade.¹⁵ Esses dados corroboram com pesquisas realizadas anteriormente, nas quais o PTS também apresentava boa linearidade.²² Uma vez que a análise de variância (ANOVA), que mede a força da evidência dos dados, foi menor que o nível de significância de 0,05, a equação linear foi confirmada.

PRECISÃO

A Tabela 2 mostra que os dados não estão dentro da faixa recomendada de precisão, porque a porcentagem

Figura 3. Representação linear dos resultados da validação.

de recuperação deve ser de $100 \pm 30\%$.¹⁵ Ao aplicar a equação obtida por regressão linear para corrigir os dados, os valores estavam dentro do limite aceitável, exceto para a concentração de 0,125 EU/mL (tabela 3). Portanto, concentrações de 1 a 0,25 EU/mL podem ser consideradas precisas. Em estudo anterior, o PTS®

apresentou resultados significativamente diferentes entre a concentração da amostra e a leitura realizada pelo equipamento, o que comprometeu a aprovação desse critério.²²

EXATIDÃO

As concentrações de 1 a 0,125 EU/mL atenderam aos critérios de exatidão, ou seja, todos os valores estavam dentro de 30% do controle (Tabela 4) 15. Estudos anteriores também relataram que o PTS® era exato.^{23,24}

ESPECIFICIDADE

Para esses critérios, apenas concentrações exatas foram usadas. Após a correção dos dados, o limite de sensibilidade do cartucho de 0,050 EU/mL passou para 0,14 EU/mL. O método alternativo em estudo foi caracterizado por apresentar resultados positivos em concentrações superiores à sua sensibilidade (1,0; 0,5;

TABELA 2. DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DO MÉTODO CONVENCIONAL EM COMPARAÇÃO AO MÉTODO ALTERNATIVO.

Método Convencional (EU/mL)	Método Alternativo (EU/mL)			
	1	0,5	0,25	0,125
Replicata 1	0,336	0,173	0,089	<0,050
Replicata 2	0,451	0,165	0,121	0,063
Replicata 3	0,365	0,185	0,092	0,061
Replicata 4	0,410	0,158	0,093	<0,050
Replicata 5	0,413	0,193	0,087	<0,050
Replicata 6	0,369	0,193	0,080	0,059
Média	0,391	0,178	0,094	0,061
Taxa Média de Recuperação	39,1	35,6	37,6	48,8

Dados com "<" não foram incluídos nos cálculos da média e do desvio padrão.

TABELA 3. RESULTADOS OBTIDOS A PARTIR DA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ALTERNATIVO APÓS CORREÇÃO COM A EQUAÇÃO OBTIDA A PARTIR DE REGRESSÃO LINEAR.

Método Convencional (EU/mL)	Método Alternativo (EU/mL)			
	1	0,5	0,25	0,125
Replicata 1	0,874	0,454	0,237	< 0,14
Replicata 2	1,170	0,433	0,320	0,170
Replicata 3	0,949	0,485	0,245	0,165
Replicata 4	1,065	0,415	0,248	< 0,14
Replicata 5	1,072	0,505	0,232	< 0,14
Replicata 6	0,959	0,505	0,214	0,160
Média	1,015	0,466	0,249	0,165
Taxa Média de Recuperação	101,5	93,2	99,5	132

Dados com "<" não foram incluídos nos cálculos de média e desvio padrão.

TABELA 4. COEFICIENTE DE VARIAÇÃO OS DADOS DE VALIDAÇÃO CORRIGIDOS PELA EQUAÇÃO DA RETA OBTIDA PELA REGRESSÃO LINEAR.

Método Alternativo (EU/mL)	Concentração de endotoxina (EU/mL)			
	1	0,5	0,25	0,125
Média	1,015	0,466	0,249	0,165
Desvio padrão	0,107	0,038	0,037	0,005
Coeficiente de variação (%)	10,55	8,17	14,65	3,12

0,25 EU/mL). Esses resultados coletivamente levam à confirmação da especificidade do método (Tabela 3).¹⁵

LIMITE DE DETECÇÃO

Os dados da Tabela 3 mostram que a concentração de 0,125 EU/mL foi a menor que apresentou 50% de resultados positivos, sendo, portanto, o limite de detecção do método alternativo em estudo. A Farmacopeia Brasileira recomenda o teste do qui-quadrado para avaliar a não inferioridade em relação ao método tradicional; no entanto, devido ao pequeno tamanho da amostra, esse teste não pôde ser aplicado.^{15,25}

LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

Com base nos resultados da precisão e exatidão, o limite de quantificação do método alternativo em estudo foi de 0,25 EU/mL.¹⁵

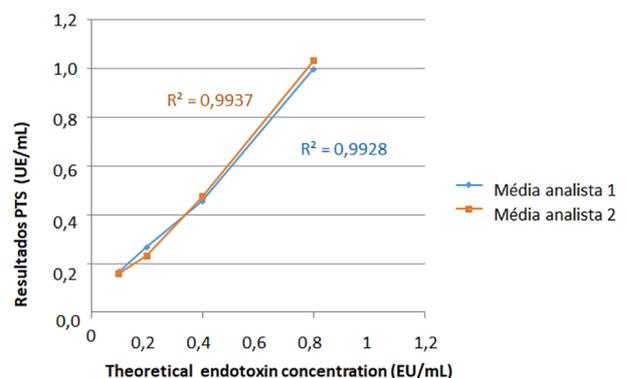
FAIXA OPERACIONAL

Com base nos resultados de precisão, exatidão e linearidade, a faixa operacional do método alternativo é de 0,25 a 1,0 EU/mL.¹⁵

ROBUSTEZ

Pela proximidade dos desvios padrão dos dois analistas (Tabela 5) e considerando que ambos os coeficientes de variação estavam acima de 0,95

(Figura 4), pode-se dizer que o método alternativo forneceu resultados reproduzíveis, confirmando sua robustez.²⁰

Figura 4. Comparação das médias de PTS® obtidas pelos dois analistas.

O PTS® foi validado para amostras livres de endotoxinas ou com níveis de 0,25 a 1,0 EU/mL, portanto, é considerado eficaz e adequado para monitorar a água tratada com diálise e o dialisato.^{15,19}

APLICABILIDADE DE MÉTODO ALTERNATIVO

A Tabela 6 mostra os resultados médios das análises realizadas pelos métodos convencional e alternativo em amostras de água tratada para diálise. Todos os resultados, independentemente do método utilizado, estão de acordo com a legislação vigente, ou seja,

TABELA 5. DISTRIBUIÇÃO DOS DADOS DOS MÉTODOS CONVENCIONAL E ALTERNATIVO POR DIA E ANALISTAS.

Método Convencional (EU / mL)	Analista 1				Analista 2			
	1	0,5	0,25	0,125	1	0,5	0,25	0,125
Método alternativo (EU / mL)								
Dia 1	0,874	0,454	0,237	<0,14	1,065	0,415	0,248	<0,14
Dia 2	1,170	0,433	0,320	0,170	1,072	0,505	0,232	<0,14
Dia 3	0,949	0,485	0,245	0,165	0,959	0,505	0,214	0,160
Média	0,998	0,457	0,267	0,168	1,032	0,475	0,231	0,160
Desvio padrão	0,154	0,026	0,046	0,004	0,063	0,052	0,017	-

Dados com "<" não foram incluídos nos cálculos de média e desvio padrão; cálculos com "-" não foram feitos.

abaixo de 0,25 EU/mL.²¹ Esses achados estão de acordo com um estudo realizado em Curitiba/PR, cujo objetivo era avaliar a qualidade da água de seis centros de diálise por 12 meses, em que 85% das amostras de água tratada para diálise estavam em conformidade com a legislação vigente.²⁶

Ao analisar amostras de dialisato (Tabela 6), houve uma limitação para determinar se os resultados estão de acordo com a legislação atual dos Requisitos de Boas Práticas Operacionais para Serviços de Diálise, pois determina apenas que as amostras de dialisato devem ser coletadas mensalmente para contagem de placas heterotróficas, sem especificar a análise de endotoxinas.²¹

Embora a Resolução do Colegiado de Diretores (RCD) no 11 de 2014 não mencione a concentração máxima permitida de endotoxina, este estudo utilizou para fins de análise o conceito de dialisato como sendo o resultado da diluição, em proporções apropriadas, do concentrado polieletrólítico para hemodiálise em água tratada para diálise.²¹

A RCD nº 8, de 2 de janeiro de 2001, fornece boas práticas de fabricação para o concentrado de hemodiálise polieletrólítica e determina que a concentração máxima de endotoxina permitida é de 0,5 EU/mL até a data de vencimento estabelecida pelo fabricante.²⁷ Portanto, uma previsão para um limite máximo de endotoxina de 0,75 EU/mL (0,5 + 0,25 EU/mL) pode ser presumido.

Desconsiderando a proporção entre água e concentrado polieletrólítico, a RCD no 11 de 2014 afirma que a bactéria heterotrófica máxima permitida para o dialisato é de 200 UFC/mL. Aparentemente, essa é a soma da concentração máxima permitida

para água tratada para diálise, 100 UFC/mL, e para o concentrado polieletrólítico, 100 UFC/mL, expresso na RCD no 8 de 2001.^{21,27}

Considerando esse limite, três amostras estariam fora do limite de especificação. No entanto, não houve relato de reação pirogênica, possivelmente porque o dialisato foi coletado na mangueira que transporta água para o dialisador de polissulfona, que pode reter endotoxinas.²⁸ Esses dados corroboram com pesquisas anteriores comparando dois tipos de membrana de dialisato, polissulfona e polietersulfona. Os autores concluíram que ambos são eficazes na prevenção da passagem de endotoxinas possivelmente presentes no dialisado.²⁹

Devido ao seu potencial, os autores testaram membranas feitas de polissulfona de diferentes marcas e observaram que existe uma diferença de permeabilidade entre elas, justificando a avaliação de desempenho pelos fabricantes.³⁰ O reprocessamento dos dialisadores pode comprometer a qualidade da membrana e alterar sua permeabilidade.⁹

Um estudo realizado em 30 centros de diálise na Alemanha analisou a concentração de endotoxina em amostras de água tratada para diálise e dialisato, que variaram de 0 a 95 EU/mL e 0 a 487 EU/mL, respectivamente. Os autores estavam preocupados com os altos níveis, propondo uma regulamentação mais rigorosa. O artigo, no entanto, não se refere à reutilização de dialisadores.¹¹

No Brasil, na cidade de Ponta Grossa/PR, foi realizado um levantamento para determinar a qualidade da água e do dialisato de 62 amostras coletadas no sistema de hemodiálise de novembro de 2003 a abril de 2004: a presença de endotoxina

TABELA 6. COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DO NÍVEL DE ENDOTOXINA PELO MÉTODO CONVENCIONAL E ALTERNATIVO DAS AMOSTRAS DE ÁGUA TRATADA PARA DIÁLISE E DIALISATO.

Amostragem	Método	Nível de Endotoxina (UE/mL)							
		Água tratada para diálise				Dialisato			
		Osrose	Tanque	Reuso	Loop	Maq. 1	Maq. 2	Maq. 3	Maq. 4
1	Convencional	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	< 0,25	< 0,25	< 0,25	< 0,25
	Alternativo	<0,14	<0,14	0,140	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14
2	Convencional	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	< 0,25	0,35>	<0,5	< 0,25
	Alternativo	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	0,17	0,230	<0,14
3	Convencional	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	>0,5	< 0,25	< 0,25	>0,5
	Alternativo	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	24,784	<0,14	<0,14	0,974
4	Convencional	<0,25	<0,25	<0,25	<0,25	< 0,25	< 0,25	< 0,25	>0,5
	Alternativo	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	<0,14	1,165

maq. = máquina.

foi observada apenas nas amostras que precederam a osmose reversa.³¹

Em um estudo realizado na Lituânia, foram analisadas amostras de água tratada para diálise e dialisato quanto à presença de endotoxina; 86% das amostras de água tratada para diálise e 92% das amostras de dialisato apresentaram níveis de endotoxina abaixo de 0,25 EU/mL, seguindo a Farmacopeia Europeia e as Diretrizes de Melhores Práticas Europeias para fluido de diálise puro. O estudo também relata que essas porcentagens poderiam ser maiores se o monitoramento dos níveis de endotoxina fosse feito com mais frequência.³²

Klein et al.,³³ após a realização de um estudo em 51 centros de diálise nos Estados Unidos, destacaram a necessidade de monitoramento regular dos níveis de endotoxina no dialisato, o que está de acordo com um estudo realizado na Alemanha, onde os autores chamam a atenção para a importância do monitoramento, porque os níveis de endotoxina no dialisato eram mais altos do que na água tratada para diálise.¹¹

No Brasil, existem programas de monitoramento da água de diálise em alguns estados como São Paulo e Rio de Janeiro, mas eles monitoram apenas a qualidade da água tratada em diálise.^{34,35} Por outro lado, o trabalho realizado no Estado da Bahia para propor um programa de monitoramento, também incluiu monitoramento de dialisato, mas apenas no nível de bactérias heterotróficas.³⁶ Embora importantes, essas iniciativas falham em abordar um aspecto importante da segurança do paciente.

As informações acima mencionadas foram obtidas pelo método convencional e permitem definir aspectos de risco para o paciente.²⁶ Além da elaboração e implementação de regulamentos mais rígidos, recomenda-se o uso de métodos que proporcionem resultados mais rápidos com maior sensibilidade, entre outras características promissoras.

Ao comparar os resultados dos dois métodos, todas as amostras negativas no método convencional também foram negativas no alternativo, mas uma das

quatro amostras positivas no método convencional foi negativa no método alternativo (Tabela 7). Paralelamente, os dados da Tabela 7 foram avaliados pelo Teste Exato de Fisher, mostrando uma associação significativa entre os métodos analisados.

De acordo com os dados presentes, Gee et al.³⁷ observaram concordância total dos resultados negativos nos dois métodos. No entanto, quando os resultados foram positivos no método convencional, independentemente da diluição da amostra, os resultados obtidos no PTS® foram menores, considerando os limites qualitativos (convencionais) e efetivamente quantificados (PTS®). O autor também relata que os testes quantitativos e qualitativos devem considerar uma margem de erro dupla devido à natureza biológica das endotoxinas presentes na amostra e no reagente LAL; características intrínsecas devido a diferentes analistas, laboratórios, insumos usados e amostras aumentam a variabilidade e, portanto, é comum que amostras positivas diverjam nos resultados. A Food and Drug Administration (FDA) e a Farmacopeia dos EUA admitem essa limitação e, portanto, fornecem uma faixa aceitável de recuperação em ensaios cinéticos de 50 a 200%.³⁷

De acordo com o fabricante do PTS®, para que um teste seja considerado válido, o canal de reação do cartucho e os coeficientes de variação do canal PPC em que a amostra é analisada devem ser inferiores a 25% (pico, com uma quantidade conhecida de endotoxina, 0,69 EU/mL mais amostra). Outro parâmetro a considerar é a porcentagem de recuperação de pico, que deve ser de 50 a 200%.¹⁷ Para todos os testes realizados no presente trabalho, os requisitos do fabricante do PTS® foram atendidos, conforme mostrado na Tabela 8. Portanto, pode ser considerado que os dados de validação e aplicabilidade estão de acordo com esses três parâmetros.

Segundo Williams (2001) *apud* Fukumori²³, a recuperação do pico dentro do critério de aceitação indica que a análise não está apresentando interferência no produto. Isso sugere que a água tratada para diálise e o dialisato não interferiram na

TABELA 7. COMPARAÇÃO DAS MEDIAS POSITIVA E NEGATIVA DE CADA MÉTODO.

		Método Alternativo		
		Positivo	Negativo	Total
Método convencional	Positivo	3	1	4
	Negativo	0	28	28
	Total	3	29	32

TABELA 8. CRITÉRIOS DE ACEITAÇÃO PELO FABRICANTE E OS RESPECTIVOS VALORES DE VALIDAÇÃO E APLICABILIDADE

Critérios e Aceitação	Dados de Aceitação		Dados de Aplicabilidade	
	Maior valor	Menor valor	Valor mais alto	Valor mais baixo
Coefficiente de variação dos canais de amostra	0,0 %	10,5 %	0,0 %	21,6 %
Coefficiente de variação dos canais do controle positivo do produto	0,0 %	14,3 %	0,0 %	18,3 %
Pico do <i>spike</i>	184 %	96 %	53%	175 %

análise da endotoxina. Entretanto, os fabricantes do reagente do método de coagulação em gel apontam que amostras com altas concentrações iônicas devem ser analisadas cuidadosamente, pois pode ocorrer agregação de lipopolissacarídeos, causando um falso negativo³⁸. Essa interferência potencial não foi evidente no presente estudo.

Bambauer et al.¹¹ diluíram amostras de dialisato, que possuíam bicarbonato em sua composição, a fim de evitar interferências causadas pela presença desse componente nos ensaios de LAL. Os autores também apontaram que os dialisatos compostos por diferentes tipos de concentrado polieletrólítico não influenciaram estatisticamente nos resultados dos testes.

Em um estudo que analisou a interferência da solução salina por concentrados de hemodiálise na determinação de endotoxina usando LAL, os autores concluíram que o método de coagulação em gel pode ser satisfatoriamente utilizado para a análise de fluidos em hemodiálise. O estudo também relata que o teste cromogênico compendial, por exigir mais tempo, teve seu uso limitado a situações específicas, exigindo diluições adicionais da amostra.³⁹ Como o PTS® realiza análises em um tempo reduzido de 15 minutos, a limitação do método cromogênico compendial poderia ser evitada no presente estudo, apesar de as amostras não terem sido diluídas.

Uma pesquisa que realizou a validação do PTS® considerou como critérios aceitáveis o coeficiente de variação dos canais 1 e 3, o coeficiente de variação dos canais 2 e 4 e a porcentagem de recuperação de picos, concluindo que o PTS® pode substituir o método de coagulação em gel.²³ Os outros critérios de validação descritos por compêndios oficiais e organizações internacionais, não foram aplicados pelo autor.^{15,19,20}

Estudo semelhante, que considerou os mesmos três critérios, analisou amostras de produtos biofarmacêuticos e água para produtos injetáveis, concluindo que ambos apresentaram resultados negativos quando analisados pelo PTS® e pelo método de coagulação em gel. Os autores enfatizaram o fato

de o PTS® ser um sistema miniaturizado, reduzindo o volume de amostra usado no teste e minimizando a manipulação de analistas e o risco de contaminação exógena. Eles também apontam que o PTS® forneceu resultados em 15 minutos enquanto o método de coagulação em gel levou 1h.⁴⁰ Nesta comparação, os autores não enfatizaram o tempo de preparação da amostra e do reagente, nem mesmo para o número da amostra e as repetições.

No presente estudo, o tempo de preparação das amostras e reagentes no método convencional foi de cerca de 45 minutos, enquanto no PTS® foi de 15 minutos. Durante os 15 minutos de PTS®, foram realizadas a manipulação da amostra e do cartucho, bem como a inserção dos dados no dispositivo, uma vez que não houve necessidade de preparação do reagente, o que justifica o menor tempo nesta etapa.

A análise levou 60 minutos no método convencional e, em média, 15 minutos no PTS®. Observou-se que quanto maior o nível de endotoxina presente na amostra, menor o tempo de análise do dispositivo.

Durante o estudo de aplicabilidade, 8 amostras foram analisadas em triplicata por dia; portanto, o tempo total gasto no método convencional foi de 115 min, enquanto no PTS® foi de 60 min por amostra, perfazendo um total de 480 min para analisar as 8 amostras em triplicata. Portanto, em relação ao tempo de análise, o PTS® foi rápido no que diz respeito ao monitoramento *in loco*, envolvendo a análise de algumas amostras. Enquanto em laboratório, com muitas amostras, o PTS® pode consumir muito tempo.

O monitoramento da qualidade da água tratada para diálise e dialisato é de fundamental importância para a qualidade e segurança do tratamento. Portanto, a legislação atual determina que análises mensais de endotoxinas sejam feitas no dialisato, semelhante à determinação da contagem de bactérias heterotróficas no dialisato.

No entanto, os compêndios oficiais descrevem métodos de teste de rotina que exigem alto tempo de análise e alto nível de manipulação pelo analista. O

presente estudo mostrou que o PTS®, como método alternativo automatizado, é adequado em relação ao tempo de análise ao lidar com análises *in loco* e em tempo real. No entanto, para laboratórios que realizam várias análises diárias, consome mais tempo que o método convencional. Dados os resultados da validação e as concentrações escolhidas para o estudo e de acordo com o tipo de amostra analisado, o PTS® foi adequado para amostras que se espera estarem ausentes de endotoxinas ou dentro da faixa operacional de 0,25 a 1 EU/mL.

AGRADECIMENTO

Os autores gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa, à Dra. Edwa Bucovic e ao mestre Vinicius Tadeu Ramires pela colaboração.

CONTRIBUIÇÃO DO AUTOR

Gabriela Corrêa Carvalho (pesquisadora principal) projetou o estudo, realizou o trabalho experimental, fez a análise estatística dos dados e preparou o primeiro rascunho do artigo. Adriana Bugno contribuiu com a formatação do estudo e com o trabalho experimental. Adriana Aparecida Buzzo Almodovar contribuiu com a formatação do estudo e com o trabalho experimental. Fernando Pontes De Lima e Silva contribuiu com o trabalho experimental. Terezinha de Jesus Andreoli Pinto foi a supervisora da pesquisa e contribuiu em todas as etapas. Todos os autores revisaram o artigo criticamente quanto ao conteúdo intelectual e aprovaram a versão final. Todos os autores concordam em ser responsáveis pelo trabalho e garantir que quaisquer questões relacionadas à precisão e integridade do trabalho sejam investigadas e resolvidas adequadamente.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

REFERÊNCIAS

1. Daugirdas JT, Blake PG, Ing TS. Manual de diálise. 5th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2016.
2. Romão JE. Crônica: definição, epidemiologia e classificação. *J Bras Nephrol.* 2004;26(3 Suppl 1):1-3.
3. Sesso RC, Lopes AA, Thomé FS, Lugon JR, Martins CT. Brazilian chronic dialysis survey 2016 *J Bras Nephrol.* 2017 Jul/Sep;39(3):261-6.
4. Vasconcelos PDS. Monitoramento da água de diálise: um estudo de caso em uma clínica do município de Recife [monografia]. Recife (PE): Fundação Oswaldo Cruz; 2012.
5. Pontoriero G, Pozzoni P, Andrulli S, Locatelli F. The quality of dialysis water. *Nephrol Dial Transplant.* 2003 Aug;18(Suppl 7):vii21-5.
6. Silva AMM, Martins CTB, Ferraboli R, Jorgetti V, Romão Junior JE. Revisão/atualização em diálise: água para hemodiálise. *J Bras Nephrol.* 1996;18(2):180-8.
7. Pinto TJA, Kaneko TM, Pinto AF. Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos. 4th ed. São Paulo: Manole; 2015.
8. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Microbiologia. 10th ed. Porto Alegre: Artmed; 2012.
9. Coulliette AD, Arduino MJ. Hemodialysis and water quality. *Semin Dial.* 2013;26(4):427-38.
10. Ward RA. Poor nutritional status and inflammation: ultrapure dialysate. *Semin Dial.* 2004;17(6):489-97.
11. Bambauer R, Schauer M, Jung WK, Daum V, Vienken J. Contamination of dialysis water and dialysate: a survey of 30 centers. *ASAIO J.* 1994 Oct/Dec;40(4):1012-6.
12. Lima JRO, Marques SG, Gonçalves AG, Salgado Filho N, Nunes PC, Silva HS, et al. Microbiological analysis of water from hemodialysis services in São Luis, Maranhão, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2005 Apr/Jun;36(2):103-8.
13. Burmeister JE, Campos JF, Miltersteiner DR. Effect of different levels of glucose in the dialysate on the risk of hypoglycemia during hemodialysis in diabetic patients. *J Bras Nephrol.* 2012;34(4):323-7.
14. Parveen S, Kaur S, David SAW, Kenney JL, McCormick WMM, Gupta RK. Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products. *Vaccine.* 2011 Oct;29(45):8012-23.
15. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Farmacopeia brasileira. 5th ed. Brasília (DF): ANVISA; 2019. v. 1.
16. Lemgruber APM, Presgrave OAF, Presgrave RF, Alves EN, Silva RS, Gimenes I, et al. Effect of micropipette inaccuracy on performance of spectrophotometric assay for bacteria endotoxin dosage (chromogenic LAL) employed in products subjected to sanitary surveillance. *Rev Inst Adolfo Lutz.* 2011;70(3):368-72.
17. Charles River. Endosafe®-PTS™ [Internet]. Boston: Charles River; 2019; [cited 2019 Sep 07]. Available from: <https://www.criver.com/products-services/qc-microbial-solutions/endotoxin-testing/endotoxin-testing-systems/endosafe-nexgen-pts?region=3621>
18. Jasson V, Jacxsens L, Luning P, Rajkovic A, Uyttendaele M. Alternative microbial methods: an overview and selection criteria. *Food Microbiol.* 2010;27(6):710-30.
19. Parenteral Drug Association (PDA). Evaluation, validation and implementation of alternative and rapid microbiological methods (Technical Report; n. 33). Bethesda: PDA; 2013.
20. United States Pharmacopeia (USP). 40th ed. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention; United Book Press; 2017.
21. Ministério da Saúde (BR). Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 11, de 13 de Março de 2014. Dispõe sobre os requisitos de boas práticas de funcionamento para os serviços de diálise e dá outras providências. *Diário Oficial da União, Brasília (DF),* 17 jun 2014; Seção 1: 68.
22. Santos-Oliveira R. Validação do PTSTM (Portable Test System) para ensaio de endotoxina em radiofármacos (18-FDG). *Lat Am J Pharm.* 2009;28(4):633-7.
23. Fukumori NTO. Determinação de endotoxina bacteriana (pirogênio) em radiofármacos pelo método de formação de gel. Validação [dissertation]. São Paulo (SP): Universidade de São Paulo – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares; 2008.
24. Suzuki Y, Suzuki K, Shimamori T, Tsuchiya M, Niehaus A, Lakritz J. Evaluation of a portable test system for assessing endotoxin activity in raw milk. *J Vet Med Sci.* 2016 Jan;78(1):49-53.
25. Contador JL, Senne ELF. Non-parametric tests for small samples of categorized variables: a study. *Gest Prod.* 2016 Jul/Sep;23(3):588-99.

26. Figel IC. Avaliação microbiológica em sistemas de água de diálise em clínicas especializadas de Curitiba, PR [dissertation]. Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2011.
27. Ministério da Saúde (BR). Resolução RDC nº 8, de 2 janeiro 2001. Aprova o regulamento técnico que institui as boas práticas de fabricação do Concentrado Polieletrólitos para Hemodiálise - CPHD. Diário Oficial da União, Brasília (DF), 7 jan 2001: Seção 1.
28. Fresenius Medical Care (FMC). Dialisadores FX Classix [Internet]. Rio de Janeiro: Fresenius Medical Care Ltda; 2019; [cited 2019 May 18]. Available from: <https://www.freseniusmedical-care.com.br/pt-br/profissionais-de-saude/hemodialise/dialisadores/dialisadores-fx-classix>
29. Lonnemann G, Sereni L, Lemke HD, Tetta C. Pyrogen retention by highly permeable synthetic membranes during in vitro dialysis. *Artif Organs*. 2001 Dec;25(12):951-60.
30. Bommer J, Becker KP, Urbaschek R. Potential transfer of endotoxin across high-flux polysulfone membranes. *J Am Soc Nephrol*. 1996 Jun;7(6):883-8.
31. Borges CR, Lascowski KM, Filho NR, Pelayo JS. Microbiological quality of water and dialysate in a haemodialysis unit in Ponta Grossa-PR, Brazil. *J Appl Microbiol*. 2007 Nov;103(5):1791-7.
32. Skarupskienė I, Bumblytė IA, Tamošaitis D, Venterienė J, Kuzminskis V. The level of endotoxins in hemodialysis water and dialysate in Lithuanian hemodialysis centers. *Medicina (Kaunas)*. 2010;46(8):556-60.
33. Klein E, Pass T, Harding GB, Wright R, Million C. Microbial and endotoxin contamination in water and dialysate in the Central United States. *Artif Organs*. 1990;14(2):85-94.
34. Buzzo ML, Bugno A, Almodovar AAB, Kira CS, Carvalho FH, Souza A, et al. A importância de programas de monitoramento da qualidade da água para diálise na segurança dos pacientes. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2010;69(1):1-6.
35. Ramirez SS. Água para hemodiálise no estado do Rio de Janeiro: uma avaliação dos dados gerados pelo programa de monitoramento da qualidade nos anos de 2006-2007 [monograph]. Rio de Janeiro (RJ): Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Nacional e Controle de Qualidade em Saúde; 2009.
36. Costa JSC. Proposta de monitoramento da qualidade da água utilizada no tratamento hemodialítico no estado da Bahia [dissertation]. Salvador (BA): Universidade Federal da Bahia – Instituto de Saúde Coletiva; 2012.
37. Gee AP, Sumstad D, Stanson J, Watson P, Proctor J, Kadidlo D, et al. A multicenter comparison study between the Endosafe® PTS® rapid-release testing system and traditional methods for detecting endotoxin in cell-therapy products. *Cytotherapy*. 2008;10(4):427-35.
38. Fujifilm Wako Chemicals U.S.A. Pyrostar. Interferentes en el ensayo de LAL [Internet]. North Chesterfield (VA): Fujifilm Wako Chemicals U.S.A.; 2019; [cited 2019 May 16]. Available from: <https://www.wakopyrostar.com/blog-es/post/interferentes-en-el-ensayo-de-lal/>
39. Bohrer D, Hörner R, Nascimento PC, Adaime M, Pereira ME, Martins AF, et al. Interference in the limulus amoebocyte lysate assay for endotoxin determination in peritoneal dialysis fluids and concentrates for hemodialysis. *J Pharm Biomed Anal*. 2001 Dec;26(5-6):811-8.
40. Jimenez L, Rana N, Travers K, Tolomanoska V, Walker K. Evaluation of the Endosafe® Portable Testing System™ for the rapid analysis of biopharmaceutical samples. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2010 May/Jun;64(3):211-21.